烙铁头蛇毒血小板聚素(TMVA)对动物体内血小板的聚集与止血功能

熊郁良　杨长久　王婉瑜　杨上川
(中国科学院昆明动物研究所)

摘　要

兔子实验表明静脉注射TMVA后血小板数量降低70%以上，3小时后回升，12小时左右接近正常。经注射TMVA后PF_3，PF_4活性增强，出血时间缩短，全血凝固时间也略有缩短，在不同时间内取心脏血测定结果证明血小板聚集功能降低，低剂量组呈波浪状变化，24小时尚未恢复正常。经对给药后兔子24小时及30天的病理切片检查发现仅个别动物有血栓，血小板聚集和红细胞沉积。小白鼠腹腔注射TMVA后，出血时间也明显缩短，而大剂量组5小时后出血时间略有延长。

关键词　烙铁头蛇毒血小板聚集素　血小板第3，第4因子　ADP途径　TXB_2途径　血栓

血小板聚集组份的研究国内外均极活跃，Ouyang (1978, 1980), Teng (1981) 从烙铁头蛇毒中分离纯化了血小板聚集组份，进行其结构与功能的研究，据报道体内注射该组份后30分钟血小板数降至原来的20%左右，有关其它体内研究则尚未见有报道。这次我们对湖南产烙铁头蛇毒中分离纯化所得的血小板聚集素组份进行了体内血小板聚集功能和止血作用的研究。

材料和方法

(一) 材料　TMVA本实验室纯化，肝素，TMVA，瑞斯托霉素(Ristocetin)，血小板活化因子 (PAF) Sigma公司产品，花生四烯酸 (AA) 瑞士包装，其它均为国产试剂。小白鼠，昆明种本所提供。日本大耳兔 (2.5—3 kg) 云南大学动物饲养场提供。

(二) 方法　兔子试验，正常大耳兔3—5只，给TMVA前24小时从心脏取血测定各项正常值，再经耳静脉注射不同剂量的TMVA，分别按表中所列的不同时间从心脏取血，测定各项指标，实验重复二次，取平均值。

小白鼠实验：体重20±2g健康小白鼠每组10只，雌、雄各半，摘去眼球放血混合制备富血小板血浆（PRP），用少血小板血浆（PPP）调PRP至40±2×10⁴/mm³，测定血小板聚集率（正常对照），实验组腹腔注射各种诱导剂和抑制剂，于不同时间摘出眼球放血，测定血小板聚集功能，每组重复三次取平均值。

出血时间测定：小白鼠每组10只，腹腔注射不同剂量的血小板诱导剂和抑制剂，对照组注射等量生理盐水，以不同时间在小鼠尾的同一长度，切弃尾尖后，将尾插入装有10ml生理盐水的试管中自然流血10分钟，用721分光光度计540nm比色计算出血量。

兔子出血时间用8号针刺耳静脉，用滤纸吸去血滴，记录流血时间。全血凝固时间按试管法测定，凝血酶时间、白陶土部分凝血酶时间按临床检验常规进行。

血小板第3因子（PF_3）采用凝血活酶生成方法测定。

血小板第4因子（PF_4）按肝素耐量方法测定。

实 验 结 果

（一）注射不同剂量的TMVA统计兔子血小板计数变化，兔子注射不同剂量的TMVA以后，血小板计数在30分钟内明显下降至原来的20%以下，3小时后逐渐回升，12小时基本恢复正常，血小板计数降低幅度与回升在不同剂量组之间差异不明显，结果见图1。

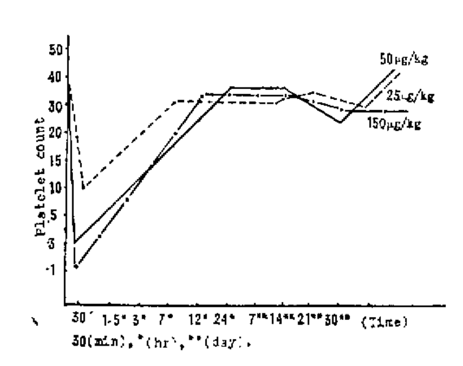


图1 TMVA对兔子血小板计数的影响

Fig. 1 Effect of TMVA injection on the platelet count of rabbit

（二）血小板第3，4因子(PF_3，PF_4)活性测定：给兔子耳静脉注射(100μg/kg)TMVA后，不同时间从心脏取血测PF_3，结果证明PF_3的活性有一定增高，凝血活酶生成时间与实验前相比有明显的缩短，见表1。

肝素耐量法测定PF_4结果表明，PF_4活性同样增强，肝素耐量在24小时内有较明显的增加，见表2。

（三）体内血小板聚集功能测定：耳静脉注射不同剂量TMVA后在不同时间心脏取血测定血小板聚集功能，结果证明血小板聚集功能随注射剂量成正比降低。低剂量组则成波浪型降低，见表3。

兔子试验得到这一结果后，我们进一步用小白鼠进行验证。从小鼠腹腔注射TMVA

（5—10μg/20g）后不同时间摘眼球取血用ADP，AA，TMVA，PAF作诱导剂测定血小板聚集率(%)，结果发现所有聚集率均显著降低，而TMVA，ADP在注射后24小时均不能诱导聚集。注射ADP（5—10μg/20g）后TMVA，ADP诱导聚集仅部份降低，而30分后TMVA诱导聚集很快恢复。注射瑞斯托霉素、AA、PAF后血小板各项聚集率均未见明显变化，见表4。

表1　TMVA对家兔体内血小板第3因子的作用（剂量100μg/kg，秒）

Table. 1 Effect of TMVA on PF_3 of rabbit (dose, 100μg/kg, time, sec)

	1 tube	2 tube	3 tube	4 tube	5 tube	6 tube
normal	24.3″	22.3″	20.3″	17.3″	18″	18″
0.5(hr)	13″	14″	14.7″	14″	14.7″	15″
3	11.6″	13″	14.2″	14.8″	15″	14.8″
7	12.6″	11.3″	13.4″	12.8″	13″	13.7″
24	11″	12″	13″	12.6″	12.8″	12″

表2　TMVA对家兔体内血小板第4因子的作用（剂量100μg/kg，分）

Table. 2 Effect of TMVA on PF_4 of rabbit (dose, 100μg/kg, time, min)

Heparin dose	3 unit	7 unit	10 unit	NaCl 0.9%
normal	6—14	15—22	22—30	3—5
0.5(hr)	6—9	11—18	17—25	2—4
3	5—9	8—14	16—22	3—5
7	6—13	12—18	18—22	3—5
24	8—12	17—21	15—21	3—5

表3　注射不同剂量TMVA对家兔血小板聚集活力的影响

Table. 3 Effect of TMVA of different dose injection on Platelets aggregation activity of rabbit

normal aggregation (%)			Time after injection (hour)									
			0.5		1.5		5		24		48	
dose	TMVA	ADP	TMVA	ADP	TMVA	ADP	TMVA	ADP	TMVA	ADP	TMVA	ADP
25μg/kg	52	51	0	0	5.2	17	22.5	13	74.3	53	13.3	17.5
50	51	53	0	0	13	21	30	16	16.2	14.5	26	25
150	55	54	0	0	0	0	0	14	13.2	11.3	17.6	18.5

* TMVA (0.15μM), ADP (4μM)

我们进一步比较了腹腔注射阿斯匹林ASA肝素10单位/20g后，对ADP，TMVA诱导的血小板聚集功能的影响，结果证明肝素对TMVA诱导的聚集影响很小，阿斯匹林则几乎无任何影响，但二者明显的抑制ADP诱导的血小板聚集，说明TMVA诱导的聚集不依赖TXB_2代谢途径。如果把10μg TMVA与10单位肝素混合注入小白鼠体内，则ADP和TMVA诱导的聚集均明显降低，见表5。

（四）出凝血时间的测定：我们给小白鼠腹腔注射TMVA，ADP，肝素和阿斯匹林后，在不同时间断尾测定出血时间，结果表明注射TMVA，ADP后5小时内出血量明显减少，但TMVA随注射剂量增大而出血量增加。肝素和阿斯匹林组出血量也增大，见表6。

我们还测定兔子出凝血时间，凝血酶时间和白陶土部份凝固时间，结果表明出凝血时间3小时内有一定缩短，其它无显著变化。见表7、8。

兔子耳静脉注射TMVA（100μg/kg）后24小时处死作病理切片检查结果表明：除低、中剂量组个别兔子肺内看到栓塞外，其它未发现明显栓塞和出血。7天和30天处死动物在心肌，肝、脾中常发现玻璃样沉积物和少数血小板凝集或红色样物质沉积，各剂量组均出现血管扩张，血管内有淋巴细胞浸润和瘀血，出血等病理变化，尤以高剂量组明显，甚至产生脑部出血等症状。这些表现是否与DIC有关，值得进一步研究。

结 果 讨 论

兔子静脉注射不同剂量的TMVA后体内血小板明显降低至正常的20%左右，但降低的幅度随剂量成正比，Oyuang(1980)从台湾产烙铁头蛇毒中分离到血小板聚集素给兔子耳静脉注射100μg/kg体重时亦同样观察到这一现象。3小时后逐步恢复正常。我们进一步观察到24小时处死动物，病理切片检查未发现血栓，但在肝、脾、心肌血管中找到玻璃样变或红色样沉积物，这就表明血小板减少可能不是因在体内大量聚集形成血栓而被消耗，而是在肝、肾中形成玻璃样变微栓塞，或为巨噬细胞吞食或在进入网状内皮系统时被扣压所致。但给药后7天处死动物则在肺部和心肌血管内发现血小板聚集和肺栓塞（仅少数动物看到），大多数动物在肝、脾内出现红色样无核巨噬细胞或铁血黄素沉积，大多数动物血管扩张，各种组织出现出血，瘀血现象和淋巴细胞浸润，多核白血球浸润，这点与国外Jakeb报道PAF能增加血管通透性，使大分子物质溢出血管外的炎症增加过程相似，但我们尚看到肝、心肌、脾、脑等组织出现出血和瘀血现象，也就是说TMVA对血小板的激活聚集作用可能与体内DIC形成有关，值得进一步研究。

注射TMVA后PF_3活性增加，这点与Ouyang从台湾产烙铁头血小板聚集素在体内观察结果一致。我们尚进一步观察到PF_4活性同样增加，这与体外肝素不能抑制TMVA活性是一致的。

兔子和小白鼠体内注射TMVA后不同时间采血用TMVA，ADP，AA，PAF为诱导剂测定血小板聚集率（%），结果表明TMVA，ADP几乎在24小时内不能诱导聚集AA，PAF也有显著降低，而注射其它诱导剂仅自身诱导聚集率有一定降低，但注射PAF后几乎未见变化，同时注射环氧化酶抑制剂阿司匹林，TMVA诱导聚集不降低，ADP则显

表 4　小白鼠腹腔注射不同诱导剂后对血小板功能的影响

Table. 4 Effect of different inducers injection on platelets aggregation activity of mouse

		Normal control				Time after injection (hour)															
						0.5				3				24				1			
dose: μg/a mouse		ADP	TMVA	AA	PAF	ADP	TMVA	AA	PAF	ADP	TMVA	AA	PAF	ADP	TMVA	AA	PAF	ADP	TMVA	AA	PAF
ADP	10μg	62	64	72	74	40	41	51	63	42	68	72	75	40	54	61	67	25	48	64	70
	5μg	62	64	72	74	35	42	58	63	65	72	75	68	44	60	62	65				
TMVA	10μg	62	64	72	74	0	0	27	33	0	0	15	36	0	0	44	38				
	5μg	62	64	72	74	0	0	20	38	0	0	40	41	0	0	41	38				
Risi	10^4μg	62	64	72	74	57	69	77	78	30	38	66	55	46	70	71	78				
AA	100μg	62	64	72	74	60	66	72	71	36	68	55	64	45	53	60	65				
PAF	10μg	62	64	72	74					52	51	53	74	48	71	71	60				
	5μg	62	64	72	74	45	67	58	76	47	70	65	71								

表 5　小白鼠对注射肝素、阿斯匹林、TMVA 和 ADP后对血小板功能的影响

Table. 5 Effect of Heparin, Asprin, TMVA & ADP injection on platelets aggregation activity of mouse

	dose: μg or unit/a mouse								Hep	
	Hep 10unit		TMVA 10μg		ADP 10μg		Asp 5 mg		TMVA 10μg+10unit	
inducers	ADP	TMVA	ADP	TMVA	ADP	TMVA	ADP	TMVA	ADP	TMVA
Experiment aggregation %	11	41	0	0	40	59	23	63	12	25
NaCl (0.9%) aggregation %	57	59	57	59	57	61	58	62	55	57

表6 小白鼠对注射不同诱导剂和抑制剂后出血量的测定（分光光度计测定）

Table. 6 Measurement of bleeding after different inducers and depressant injection of mouse (spectrophometry)

	Tails have been cutted at an interval of				
	10—30 min	1—2 hr	3—5 hr	5—6 hr	24 hr
NaCl 0.9%	0.524±0.185	0.674±0.125	0.712±0.125	0.665±0.291	0.632±0.157
TMVA 1 μg/20g	0.185±0.102	0.132±0.113		0.439±0.154	0.413±0.269
3 μg	0.245±0.093	0.298±0.210		0.848±0.203	0.792±0.132
10μg	0.379±0.181	0.778±0.186		0.671±0.253	0.809±0.212
ADP 10μg/20g	0.203±0.151	0.393±0.121		0.467±0.202	0.662±0.211
Aspirin 5 mg/20g		0.696±0.213		0.671±0.213	0.863±0.121
Heparin 10unit/20g		0.861±0.088	0.956±0.265		0.941±0.285
Heparin 10unit+TMVA 10μg/20g		1.367±0.182	1.287±0.202		

表 7　兔子静脉注射 TMVA 对凝血、出血时间的影响（分、秒）

Table. 7 Effect TMVA intravenous injection on clotting time and bleeding time of rabbit (min, sec)

	Time after TMVA injection (100μg/kg)					
	normal	0.25 hr	0.5 hr	3 hr	7 hr	24 hr
Clotting time	4′30″	4′20″	4′15″	3′40″	4′50″	4′12″
Hemorrhagia time	1′20″	37″	40″	1′10″	1′15″	56″

表 8　兔子静脉注射 TMVA 对全血凝固时间的影响（分、秒）

Table. 8 Measurement of clotting time ets. after TMVA intravenous injection of rabbit

			25 μg/kg	50 μg/kg	150 μg/kg
Time after injection (day)	normal	CT	5′12″	5′21″	5′7″
		TT	10.6″	10.8″	12″
		KPTT	42.2″	43.1″	42.1″
	7	CT	5′40″	5′47″	8′12″
		TT	10.3″	9.5″	10″
		KPTT	42.3″	43.3″	41.6″
	14	CT	5′12″	7′4″	8′11″
		TT	9.7″	8.3″	8.8″
		KPTT	31″	32″	33″
	30	CT	5′22″	5′10″	5′40″
		TT	9″	9.1″	8.3″
		KPTT	41.7″	35.7″	36″

著降低。进一步表明TMVA是一个多途径，强有力的血小板活化诱导剂，聚集率降低与血小板计数减少和功能消耗有关，是否有其它作用有待进一步研究。注射PAF后，仅ADP部份被抑制，而PAF诱导聚集几乎无影响，表明PAF可能并非存在一条独立的活化途径，而与TMVA有明显差异。Francoise认为PAF可能不是第三条活化途径的诱导剂，同我们的结果有相似之处，值得进一步研究。

血小板聚集与止血功能密切相关，腹腔注射 TMVA，ADP 后 2 小时内出血量明显减少，而高剂量组略有增加，表明在此期间由于血小板功能被消耗，出血量有增加，这点在我们进行小白鼠断尾试验中观察到尾尖有凝块形成，而出血量反而增加相一致。注射肝素，及注射阿斯匹林组出血量均比对照组增加，尤以TMVA和肝素合用组尤为显

著。全血凝固时间，凝血酶时间和白陶土部份凝固时间无显著变化，这一结果表明TMVA对凝血活酶生成等无明显影响。

综上所述，TMVA体内外实验结果证明它既可通过ADP诱导的血小板活化途径，又可不通过ADP和TXB_2途径诱导血小板产生聚集，是一个新的活性极强的血小板活化诱导剂。

参 考 文 献

周振业等 1977 血液凝固及出血性疾病的实验诊断。宁夏人民出版社

熊郁良等 1984 烙铁头*Trimeresurus mucrosquamatus*蛇毒血小板聚集的研究。两栖爬行动物学报 3(4)：61—66

Francoise Wal *et al.*, 1985 PAF-acether may not mediate the third pathway of platelet aggregation since-desensitiza-tion reduces the effects of low thrombin but enhances those of convulxin. Thrombosis and Haemostasis F. K. Schattauer Verlag Gmbh. 99—103

Ouyang *et al.*, 1978 The effect of *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom on platelet aggregation. *Toxicon* 16(6):575—582

Ouyan *et al.*, 1979 The action mechanism of the purified platelet aggregation principle of *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. Thrombos Haemoslas 41:475—490

Ouyang *et al.*, 1980 Apotent platelet aggregation inducer purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *BBA* 630:246—253

Ruan Changgen and Xiong Yuliang 1983 Venins de serpents pour l'etude des foction plaquetaires. *Medecinecardiovasculaire*. 310:43—45

Teng Cheming *et al.*, 1981 Vitrastructural changes and release reaction of platelet induced by an aggregation inducer from *Trimeresurus mucrosquamatus* (Formosan habu) snake venom. *Toxicon* 19:121—130

STUDY OF PLATELETS AGGREGATION AND THE EFFECT OF HEMOSTASIE IN VIVO BY TMVA*

Xiong Yuliang　Yang Chengjiu　Wang Wanyu　Yang Shangchuan

(Kunming Institute of Zoology, Academia sinica)

Results of experiment on rabbit indicate, after the injection of TMVA intravenously, the counting of blood platelets obviously dropped to 30% of the original. It gradually raised after three hours and it became normal about 12 hours afterwards. No thrombus discovered from animals killed from 24 hours to 30 days. Aggregation of platelets and deposition of red blood cell appeared in only a few of those animals. Blood taken from hearts at various intervals for testing experiments of platelets aggregation results showed that obvious decrease in aggregation function of platelets through exhaustion. It was impossible for all of them return to normal 24 hours afterwards except those groups treated with lower dosage. Whole blood coagulation time, PF_3; PF_4 activity raised, Shightly shorter at 3 hours bleeding time shorter within 30 minutes no other obvious changes appeared. Determination of platelets aggregation function at various stages showed obvious decrease.

Through exhaustion of the aggregation function, except that wave-like variations appeared for those treated with low dosage. Mouse injected with TMVA. The bleeding time obviously became shorter within 30 minutes, those groups treated with high dosage prolonged after 5 hours.

Key words　TMVA　PF_3　PF_4　Hemostasie　Thrombus

* *Trimeresurus mucrosquamatus* venom platelets aggregation